

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-245657

(P2001-245657A)

(43) 公開日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | メモ (参考) |
|---------------------------|-------|--------------|---------|
| C 1 2 N 1/20 | | C 1 2 N 1/20 | A |
| 1/14 | | 1/14 | A |
| 9/04 | Z N A | 9/04 | Z N A Z |
| 11/00 | | 11/00 | |
| C 1 2 P 7/58 | | C 1 2 P 7/58 | |

審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-394766 (P2000-394766)

(22) 出願日 平成12年12月26日 (2000. 12. 26)

(31) 優先権主張番号 特願平11-369714

(32) 優先日 平成11年12月27日 (1999. 12. 27)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 594178974

竹原化学工業株式会社

兵庫県明石市中崎 1 丁目 9 番 7 号

(71) 出願人 591030499

大阪市

大阪府大阪市北区中之島 1-3-20

(72) 発明者 北畑 寿美雄

大阪府大阪市城東区森之宮 1 丁目 6 番 50 号

大阪市立工業研究所内

(74) 代理人 100095555

弁理士 池内 寛幸 (外 3 名)

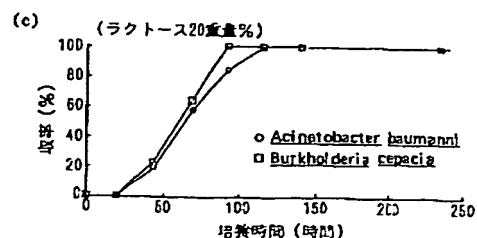
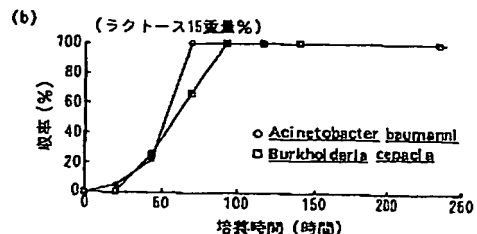
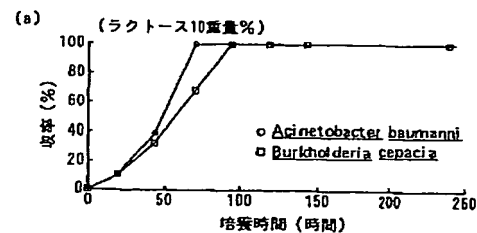
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルドン酸を産生する新規菌体およびその酵素

(57) 【要約】

【課題】 ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する酵素を産生する新規菌体を提供する。

【解決手段】 アシネトバクター バウマンニ No. 7W2-3 (*Acinetobacter baumannii* No. 7W2-3) (FERM P-17631)、ブルクホルデリア セパシア No. 24-2-1 (*Burkholderia cepacia* No. 24-2-1) (FERM P-17632)、不完全菌類 28-2 株 (FERM P-18103) および不完全菌類 KD-3 株 (FERM P-18104) によれば、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化することができる。これらの菌体をラクトース含有培地で培養すれば、図 1 に示すように、ラクトースを完全にラクトビオン酸に変換できる。



(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アシネトバクター属 (*Acinetobacter*) の菌体であって、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する新規菌体。

【請求項2】 アシネトバクター属 (*Acinetobacter*) の菌体が、アシネトバクター バウマンニ No. 7W2-3 (*Acinetobacter baumannii* No. 7W2-3) (FERM P-17631) である請求項1記載の新規菌体。

【請求項3】 ブルクホルデリア属 (*Burkholderia*) の菌体であって、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する新規菌体。

【請求項4】 ブルクホルデリア属 (*Burkholderia*) の菌体が、ブルクホルデリア セパシア No. 24-2-1 (*Burkholderia cepacia* No. 24-2-1) (FERM P-17632) である請求項3記載の新規菌体。

【請求項5】 ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する不完全菌類の新規菌体28-2株 (FERM P-18103)。

【請求項6】 ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する不完全菌類の新規菌体KD-3株 (FERM P-18104)。

【請求項7】 ヘミアセタール水酸基を有する糖が、D-マンノース、D-ガラクトース、D-リボース、D-キシロース、L-アラビノース、セロビオース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、メリビオースおよびラクトースからなる群から選択された少なくとも一つの糖である請求項1～6のいずれか一項に記載の新規菌体。

【請求項8】 アシネトバクター属 (*Acinetobacter*) の菌体由来であり、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する新規酵素。

【請求項9】 アシネトバクター属の菌体が、アシネトバクター バウマンニ No. 7W2-3 (*Acinetobacter baumannii* No. 7W2-3) (FERM P-17631) である請求項8記載の新規酵素。

【請求項10】 ブルクホルデリア属 (*Burkholderia*) の菌体由来であり、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する新規酵素。

【請求項11】 ブルクホルデリア属の菌体が、ブルクホルデリア セパシア No. 24-2-1 (*Burkholderia cepacia* No. 24-2-1) (FERM P-17632) である請求項10記載の新規酵素

【請求項12】 不完全菌類の新規菌体28-2株 (FERM P-18103) 由来であり、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する新規酵素。

【請求項13】 不完全菌類の新規菌体KD-3株 (FERM P-18104) 由来であり、ヘミアセタール

2

水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する新規酵素。

【請求項14】 ヘミアセタール水酸基を有する糖が、D-マンノース、D-ガラクトース、D-リボース、D-キシロース、L-アラビノース、セロビオース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、メリビオースおよびラクトースからなる群から選択された少なくとも一つの糖である請求項8～13のいずれか一項に記載の新規酵素。

【請求項15】 請求項1～7のいずれか一項に記載の菌体を培養する工程を含む、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する新規酵素の製造方法。

【請求項16】 請求項1～7のいずれか一項に記載の菌体を、ヘミアセタール水酸基を有する糖に接触させるアルドン酸の製造方法。

【請求項17】 菌体を、ヘミアセタール水酸基を有する糖を含む培地で培養する請求項16記載のアルドン酸の製造方法。

【請求項18】 担体に固定化させた菌体を、ヘミアセタール水酸基を有する糖に接触させる請求項16記載のアルドン酸の製造方法。

【請求項19】 ヘミアセタール水酸基を有する糖が、D-マンノース、D-ガラクトース、D-リボース、D-キシロース、L-アラビノース、セロビオース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、メリビオースおよびラクトースからなる群から選択された少なくとも一つの糖である請求項16～18のいずれか一項に記載のアルドン酸の製造方法。

【請求項20】 請求項8～14のいずれか一項に記載の酵素を、ヘミアセタール水酸基を有する糖に接触させるアルドン酸の製造方法。

【請求項21】 担体に固定化させた酵素を、ヘミアセタール水酸基を有する糖に接触させる請求項20記載のアルドン酸の製造方法。

【請求項22】 ヘミアセタール水酸基を有する糖が、D-マンノース、D-ガラクトース、D-リボース、D-キシロース、L-アラビノース、セロビオース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、メリビオースおよびラクトースからなる群から選択された少なくとも一つの糖である請求項20または21記載のアルドン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、アルドン酸を産生する新規菌体およびその酵素に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、健康増進を目的とした様々な健康・栄養補助剤が開発されている。その中でもアルドン酸

(3)

3

は、カルシウムや鉄等の金属との塩形態である場合に、水溶性を示すことから、ミネラル補強剤として優れており、特に注目されている。また、オリゴ糖を酸化して得られるアルドン酸は、オリゴ糖のヘミアセタール水酸基が酸化されていることから、生体内加水分解酵素等による分解を受け難い。このため、人が摂取した際、分解されることなく腸内に到達でき、ビフィズス菌増殖を誘発する因子として利用することが可能である。このような特性を有するため、各種糖からアルドン酸を容易に製造することが望まれている。

【0003】糖のヘミアセタール水酸基を酸化触媒する酵素としては、グルコースオキシダーゼ（以下、「GOD」という）が最も広く知られており、利用されている（特開昭57-86283号公報）。しかしながら、GODやGOD産生菌による作用は、D-グルコースに特異的であり、これ以外の糖には全く作用しない。

【0004】また、オリゴ糖に対する酸化活性を示す酵素としては、紅藻類由来のヘキソース酸化酵素が知られているが、その性質は明らかにされていない（「酵素ハンドブック」第68頁～第69頁、朝倉書店）。オリゴ糖酸化酵素としては、この他に、グルコースが α -1, 4および β -1, 4結合しているオリゴ糖類に特異的に作用するグルコオリゴ糖酸化酵素が報告されている（*Biochemica et Biophysica Acta*, 1118, 第41頁～第47頁（1991）、特開平5-84074号公報）。しかし、このオリゴ糖酸化酵素は、マルトオリゴ糖およびセロオリゴ糖以外の基質に対する作用が弱く、特にグルコース以外の単糖類には全く作用しない。

【0005】糖中のヒドロキシメチル基およびヘミアセタール水酸基を酸化してカルボン酸にする微生物についても報告されている（特開平7-76594号公報）が、この場合、ヒドロキシメチル基およびヘミアセタール水酸基の両方に作用するため、ヘミアセタール水酸基のみを特異的に酸化することが困難である。

【0006】このような公知の微生物あるいは酵素は、前述のように、利用できる基質が限られていたり、触媒部位の選択性が低いため、各種アルドン酸の製造に利用することが困難であった。

【0007】また、前記各種糖を化学的に酸化する公知の方法では、一般的に、高い収率でアルドン酸生成物を得ることが困難であった。例えば、酸化反応の位置選択性は充分ではなく、副反応生成物を生じるため収率が低く、また反応生成物の分離精製が煩雑であるため、コストの面においても十分な結果が得られなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明の目的は、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する新規菌体およびその酵素の提供である。

【0009】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するため

4

に、本発明者は、自然界の様々な菌を分離培養した結果、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する、アシネトバクター属 (*Acinetobacter*) の新規菌体、ブルクホルデリア属 (*Burkholderia*) および不完全菌類の新規菌体を単離することに成功し、本発明に至った。本発明の新規菌体によれば、ヘミアセタール水酸基を有する糖であればその種類に特に制限されず、例えば、後述する各種糖のヘミアセタール水酸基を酸化してそのアルドン酸を産生することができる。本発明において、アルドン酸とは、単糖であるアルドースのヘミアセタール水酸基が酸化されたものには限定されず、還元末端にアルドース構造を有する二糖以上の多糖のヘミアセタール水酸基が酸化されたものを含み、また、これらの塩の形態も含む。

【0010】本発明において、使用できる前記ヘミアセタール水酸基を有する糖は、例えば、グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-リボース、D-キシロース、L-アラビノース等の単糖、セロビオース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、メリビオース、ラクトース等のオリゴ糖があげられる。この中でも好ましくはD-グルコース、D-ガラクトース、D-キシロース、L-アラビノース、セロビオース、マルトース、ラクトースであり、特に好ましくはラクトースである。本発明の新規菌体によれば、例えば、グルコースをグルコン酸に、D-マンノースをマンノン酸に、D-ガラクトースをガラクトン酸に、D-リボースをリボン酸に、D-キシロースをキシロン酸に、L-アラビノースをアラボン酸に、セロビオースをセロビオン酸に、マルトースをマルトビオン酸に、マルトトリオースをマルトトリオン酸に、マルトテトラオースをマルトテトラオン酸に、マルトペンタオースをマルトペンタオン酸に、メリビオースをメリビオン酸に、ラクトースをラクトビオン酸に変換できる。以下、本発明において「糖」とは、ヘミアセタール水酸基を有する糖をいう。

【0011】本発明のアシネトバクター属の新規菌体としては、例えば、アシネトバクターバウマンニ No. 7W2-3 (*Acinetobacter baumannii* No. 7W2-3) (FERM P-17631) が、ブルクホルデリア属の新規菌体としては、例えば、ブルクホルデリアセバシア No. 24-2-1 (*Burkholderiacepacia* No. 24-2-1) (FERM P-17632) があげられる。また、不完全菌類としては、例えば、28-2株 (FERM P-18103)、KD-3株 (FERM P-18104) があげられる。

【0012】アシネトバクターバウマンニ No. 7W2-3 (*Acinetobacter baumannii* No. 7W2-3) (FERM P-17631) は、前述のように、本発明者らが土壤中より新規に単離した菌体であり、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM

50

(4)

5

P-17631 (受託日:平成11年11月4日)で寄託されている。なお、本菌株の菌学的特性は、下記に示すとおりである。

【0013】(形態的特性)

培養温度 : 30℃
 形状 : 桿菌
 大きさ : 0.8×1μm
 運動性の有無 : なし
 胞子の有無 : なし

【0014】

(培養的性質)

コロニー形態 : 円形
 全縁滑らか
 凸状
 光沢有り
 クリーム色

【0015】

(生理学的性質)

| | |
|-----------------|-----|
| グラム染色 : | 陰性 |
| カタラーゼ : | + |
| オキシダーゼ : | - |
| O/F試験 : | - |
| 硝酸塩還元 : | - |
| インドール産生 : | - |
| ブドウ糖酸性化 : | - |
| アルギニンジヒドロラーゼ : | - |
| ウレアーゼ : | - |
| エスクリン加水分解 : | - |
| ゼラチン加水分解 : | - |
| β-ガラクトシダーゼ : | - |
| 基質資化能 | |
| ブドウ糖 | + |
| Ｌ-アラビノース | + |
| Ｄ-マンノース | +/- |
| Ｄ-マンニトール | - |
| Ｎ-アセチル-Ｄ-グルコサミン | - |
| マルトース | - |
| グルコン酸カリウム | + |
| n-カプリン酸 | + |
| アジピン酸 | + |
| DL-リンゴ酸 | +/- |
| クエン酸ナトリウム | - |
| 酢酸フェニル | - |

【0016】また、ブルクホルデリア セパシア No. 24-2-1 (*Burkholderia cepacia* No. 24-2-1) (FERM P-17632) も、本発明者らが、土壤中より新規に単離した菌体であり、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM P-17632 (受託日:平成11年11月4日)で寄託されている。なお、本菌株の菌学的特性は、下記に示すと

6

おりである。

【0017】(形態的特性)

培養温度 : 30℃
 形状 : 桿菌
 大きさ : 0.7~0.8×1~1.5μm
 運動性の有無 : 有り
 胞子の有無 : なし

【0018】

(培養的性質)

コロニー形態 : 円形
 全縁滑らか
 低凸状
 光沢有り
 クリーム色~淡黄色

【0019】

(生理学的性質)

| | |
|-----------------|----|
| グラム染色 : | 陰性 |
| カタラーゼ : | + |
| オキシダーゼ : | - |
| O/F試験 : | - |
| 硝酸塩還元 : | - |
| インドール産生 : | - |
| ブドウ糖酸性化 : | - |
| アルギニンジヒドロラーゼ : | - |
| ウレアーゼ : | - |
| エスクリン加水分解 : | - |
| ゼラチン加水分解 : | + |
| β-ガラクトシダーゼ : | + |
| 基質資化能 | |
| ブドウ糖 | + |
| Ｌ-アラビノース | + |
| Ｄ-マンノース | + |
| Ｄ-マンニトール | + |
| Ｎ-アセチル-Ｄ-グルコサミン | + |
| マルトース | - |
| グルコン酸カリウム | + |
| n-カプリン酸 | + |
| アジピン酸 | + |
| DL-リンゴ酸 | + |
| クエン酸ナトリウム | + |
| 酢酸フェニル | + |

【0020】不完全菌類28-2株 (FERM P-18103) も、前述のように、本発明者らが土壤中より新規に単離した菌体であり、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号 FERM P-18103 (受託日:平成12年11月8日)で寄託されている。なお、本菌の菌学的特性は、下記に示すとおりである。

【0021】(形態的特性) ポテトデキストロース寒天、オートミール寒天、麦芽寒天の各プレートに、検体を接種し、25℃で最長8週間まで培養を行い、目視に

(5)

7

より生育状況等の観察を行った。また、検体のスライド標本を作成し、微分干渉顕微鏡および位相差顕微鏡により、微視的形態性状の観察を行った。

【0022】その結果、25℃の条件下では生育が若干遅く、培養開始1週間で1cm程度の生育を示した。菌糸は、綿毛状で密な生育を示し、白色を呈した。また、寒天内に可溶性色素の産生は見られなかった。微視的形態観察からは、培養開始後6週間を経過した検体から菌糸の生育以外に厚壁孢子(chlamydospore)が観察されたものの、有性・無性生殖器官形成は認められなかつ

94℃/2分 (initial denaturation)
→ 94℃/30秒-55℃/30秒-72℃/90秒 (30サイクル)
→ 72℃/4分 (final extension)

【0024】得られたPCR産物は、QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)で精製し、ダイレクトシーケンシングに供した。シーケンシングはBig DYE Terminatorキット (Applied Biosystems社製)を用い、ABI PRISM 377 シーケンサー (Applied Systems社製)により行った。シーケンシング用プライマーは、NS1、NS2、NS3、NS4、NS5、NS6、NS7、NS8、P、Q、RおよびSを用いた。得られた塩基配列断片を結合し、検体の18S rRNA遺伝子(18S rDNA)のうちSaccharomyces cerevisiae (J01353)の24-1768に相当する部分の塩基配列(配列番号1)を得た。そして、この塩基配列を、米国NCBI (National Center for Biotechno※

94℃/2分 (initial denaturation)
→ 94℃/30秒-52℃/30秒-72℃/90秒 (30サイクル)
→ 72℃/4分 (final extension)

【0027】そして、シーケンシング用プライマーとして、ITS2、ITS3およびITS4を用いた以外は前述と同様にしてダイレクトシーケンシングを行った。得られた塩基配列断片をAuto Assembler (Applied Biosystems社製)で結合し、目的DNA塩基配列(配列番号2)を得て、前述と同様にしてBLAST相同性検索を行い、類似の塩基配列を検索した。

【0028】この結果、28-2株(FERM P-18103)は、AJ279484と同一あるいは極めて近縁の未同定子囊菌類であると推測された。

【0029】以上の各種同定結果より、28-2株(FERM P-18103)は、Magnaporthe griseaと共通の起源を持つ不完全菌類であると推測される。なお、未同定の子囊菌類の可能性もある。

【0030】また、不完全菌類KD-3株(FERM P-18104)も、前述のように、本発明者らが土壌中より新規に単離した菌体であり、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-18104(受託日：平成12年11月8日)で寄託されている。なお、本菌株の菌学的特性は、下記に示すとおりである。

8

*た。菌糸は、直線的に生育し、比較的頻繁に分枝する。表面は粗面であり、隔壁は、分枝部等で比較的頻繁に観察され、クランプの形状は見られなかった。

【0023】(18S rDNAの塩基配列に基づく同定)菌体を凍結乾燥し、液体窒素存在下で細胞壁を破碎して、Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)を用いてDNAを抽出し、このDNAをテンプレートとしてPCRを行った。プライマーは、NS1およびNS8を用い、Gene Amp PCR System 9600 (Applied Systems社製)上で、下記条件によりPCR反応を行った。

※logyInformation)のサービスを利用して、BLAST相同性検索を行い類似の塩基配列を検索し、近隣結合法による系統樹を作成して近縁分類群を推定した。

【0025】この結果、28-2株(FERM P-18103)は、Magnaporthe griseaとブーツストラップ確立96%で有意なクラスタを形成した。

【0026】(ITS-5.8S rDNAの塩基配列に基づく同定)前述のようにして得られたDNAをテンプレートとして、ITS1領域、5.8S rRNA遺伝子、ITS2領域を含むDNA断片のPCRを行った。プライマーとしては、ITS4およびITS5を用い、Gene Amp PCR System 9600 (Applied Biosystems)上で、下記条件によりPCR反応を行った。

【0031】(形態的特性)ポテトデキストロース寒天、オートミール寒天、麦芽寒天の各プレートに、検体を接種し、25℃で最長6週間まで培養を行い、目視により生育状況等の観察を行った。また、検体のスライド標本を作製し、微分干渉顕微鏡により微視的形態性状の観察を行った。

【0032】その結果、25℃の条件下での生育は普通程度で、培養開始1週間で2~3cmの生育を示した。菌糸は、綿毛状で密な生育を示し、表面色調は当初白色だが、次第にやや灰褐色を呈した。また、寒天内に可溶性色素の産生は見られなかった。微視的形態観察からは、培養開始後1週間を経過した検体から菌糸のみの生育が認められ、培養開始後8週間を経過した検体からは、菌糸の至る所に瘤状の膨らみ(swollen cell)が観察されたものの、有性・無性生殖器官形成は認められなかった。菌糸は、直線的に生育し、比較的頻繁に分枝する。表面は滑らかからやや粗面であり、隔壁は、分枝部等で比較的頻繁に観察され、クランプの形状は見られなかった。

【0033】(18S rDNAの塩基配列に基づく同定)下記条件でPCR反応を行った以外は、前述の18

(6)

9

10

S rDNAの塩基配列に基づく同定方法と同様にして* *配列決定を行った(配列番号3)。

94℃/2分 (initial denaturation)

→ 94℃/30秒-52℃/30秒-72℃/90秒 (30サイクル)

→ 72℃/4分 (final extension)

【0034】この結果、KD-3株(FERM P-18104)は、Paraphaeosphaeriapilleata および Paraphaeosphaeria michotii と、比較可能な範囲において100%の相同性を有しており、近隣結合系統樹でも、前記2菌種とはブーツストラップ確立100%でクラスタを形成した。

【0035】(ITS-5.8S rDNAの塩基配列に基づく同定) シークエンシング用プライマーとして、ITS2、ITS3、ITS4およびITS5を使用した以外は、前述のITS-5.8S rDNAの塩基配列に基づく同定方法と同様にして配列決定を行った(配列番号4)。

【0036】この結果、KD-3株(FERM P-18104)は、Paraphaeosphaeriapilleata に近縁な不完全菌類であると推定された。

【0037】以上の各種同定結果より、KD-3株(FERM P-18104)は、Paraphaeosphaeria pileata に近縁な不完全菌類であり、Coniothyrium 属の可能性もあると推定される。

【0038】この他に、同様にして前記各種糖のヘミアセタール水酸基を特異的に酸化する酵素を産生する菌体として、例えば、シュドモナス属(Pseudomonas)、ボルデテラ属(Bordetella)、レジオネラ属(Legionella)の菌体等も、本発明者らによって単離されている。

【0039】つぎに、本発明の新規酵素は、本発明の新規菌体(アシネトバクター属、ブルクホルデリア属、不完全菌類)由来であり、糖のヘミアセタール水酸基を特異的に酸化する酵素(以下、「アルドン酸生成酵素」という)である。このような新規酵素としては、例えば、以下に示す四種類の酵素があげられる。

【0040】まず、一つ目の酵素は、アシネトバクター バウマンニ No. 7W2-3 (FERM P-17631) 由来のアルドン酸生成酵素である。

【0041】二つ目の酵素は、ブルクホルデリア セバシア No. 24-2-1 (FERM P-17632) 由来のアルドン酸生成酵素であり、通常、以下に示す理化学的性質を有する。

【0042】(理化学的性質)

安定温度 : 40℃以下

至適温度 : 55℃

安定pH : pH4.5~pH8.5

至適pH : pH6.5

【0043】つぎに、三つ目の酵素は、不完全菌類28-2株(FERM P-18103)由来のアルドン酸生成酵素であり、通常、至適pHはpH5~8付近、至適温度は46~62℃、pH4~9の範囲において60

℃付近まで安定であるという理化学的性質を有する。

【0044】四つ目の酵素は、不完全菌類であるKD-3株(FERM P-18104)由来のアルドン酸生成酵素であり、通常、至適pHはpH5~8付近、至適温度は45~58℃、pH3.5~9の範囲において60℃付近まで安定であるという理化学的性質を有する。

【0045】つぎに、本発明のアルドン酸生成酵素の製造方法は、本発明の新規菌体を培養する工程を含む方法である。これにより、本発明のアルドン酸生成酵素を容易に製造することができる。

【0046】また、本発明のアルドン酸生成酵素は、本発明の新規菌体の種類によって、菌体内酵素および菌体から分泌される菌体外酵素の二種類が存在するため、本発明の製造方法は、培養する菌体の種類に応じて、さらに精製工程を含むことが好ましい。

【0047】本発明のアシネトバクター属(Acinetobacter)の菌体またはブルクホルデリア属(Burkholderia)の菌体を使用する場合、これらの菌体由来のアルドン酸生成酵素は、菌体内酵素であるため、例えば、以下の(a)~(d)に示す精製工程等をさらに含むことが好ましい。

(a) 培養液から菌体を回収する工程。

(b) 菌体を破碎する工程。

(c) タンパク質を可溶化する工程。

(d) タンパク質を塩析する工程。

(e) タンパク質をクロマトグラフィーにより分離する工程。

【0048】なお、前記精製工程は特に制限されず、例えば、(b)工程によって得られた菌体破碎液をそのまま使用することもできる。また、これらの精製工程以外にも、例えば、限外濾過等の濃縮や、溶媒沈殿等を行ってもよい。

【0049】このような菌体内酵素である本発明のアルドン酸生成酵素は、基質(糖)と反応させる場合、例えば、菌体の状態のまま使用してもよいし、さらに前述のような工程により精製された状態であってもよく、糖のヘミアセタール水酸基を特異的に酸化する限り、その精製度に拘わらず使用できる。

【0050】一方、本発明の不完全菌体28-2株(FERM P-18103)およびKD-3株(FERM P-18104)を使用する場合、これらの菌体由来のアルドン酸生成酵素は、菌体外酵素であるため、例えば、以下の(e)~(g)に示す精製工程等をさらに含むことが好ましい。

(e) 培養液から上清を回収する工程。

(f) タンパク質を塩析する工程。

(7)

11

(g) タンパク質をクロマトグラフィーにより分離する工程。

【0051】なお、前記精製工程は特に制限されず、例えば、(e)工程によって得られた培養液上清をそのまま使用することもできる。また、これらの精製工程以外にも、例えば、限外濾過等の濃縮や、溶媒沈殿等を行ってもよい。菌体外酵素である本発明のアルドン酸生成酵素は、例えば、糖のヘミアセタール水酸基を特異的に酸化する限り、その精製度に拘わらず使用できる。

【0052】また、以上のような精製工程により精製されたアルドン酸生成酵素について、そのアミノ酸配列の決定および遺伝子配列の決定を行なうことが好ましい。例えば、本発明のアルドン酸生成酵素について、常法によりアミノ酸配列の決定を行ない、これをもとにその遺伝子配列を推測する。そして、常法の化学合成等によりDNA断片やRNA断片等を作製し、これをプライマー、プローブ等として使用し、本発明の新規菌体からアルドン酸生成酵素をコードする遺伝子をクローニングし、遺伝子配列を決定する。このようなクローニングにより得られた遺伝子や化学合成断片等を用いて、例えば、アルドン酸生成酵素を発現する組換え体等を作製してもよい。

【0053】つぎに、本発明のアルドン酸製造方法は、本発明の新規菌体を糖に接触させる方法である。例えば、前記糖を含む培地で前記菌体を培養する方法、前記菌体をそのまま触媒として前記糖と反応させる方法、担体に固定化した前記菌体を前記糖に接触させる方法等があげられる。このように、本発明の新規菌体を接触させるだけで、容易にアルドン酸生成を行なうことができる。

【0054】また、本発明のアルドン酸製造方法は、本発明の新規酵素を糖に接触させる方法であってもよく、例えば、前記酵素をそのまま触媒として前記糖と反応させる方法や、担体に固定化した前記酵素を前記糖に接触させる方法等があげられる。

【0055】

【発明の実施の形態】本発明のアルドン酸生成酵素を産生する新規菌体のスクリーニングの一例を以下に示す。例えば、土壌中の菌体を分離培養し、その培養液を用いてヘミアセタール水酸基を有するラクトースの酸化反応を行い、得られた反応液を薄層クロマトグラフィー(TLC)および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等により分析して行うことができる。なお、糖として

TLCプレート; kieselgel 60 (メルク社製)

展開溶媒; 酢酸エチル: 酢酸: 水 = 3: 1: 1

検出試薬A; 50体積%硫酸-エタノール溶液

検出試薬B; 40重量%メタバナジン酸アンモニウム水溶液(5ml)と50重量%硫酸-エタノール溶液(50ml)との混合液

【0062】(方法) 前記反応液約0.5μlをシリ

12

*は、以下に示すラクトースには制限されず、前述のような各種糖を使用できる。

【0056】(1) 培養方法

以下に示すスクリーニング用寒天培地および液体栄養培地を、予め、オートクレーブにより121℃で20分間滅菌する。そして、一白金耳の土壌サンプルを滅菌水10mlに懸濁し、その上清液10μlを滅菌水9.9mlで希釈する。この希釈液100μlを、ラクトースを唯一の炭素源とする前記スクリーニング用寒天培地に塗布し、28℃で2~7日間静置培養する。そして、生育したコロニーを単離して前記滅菌済みのスクリーニング用液体栄養培地5mlに接種し、28℃で2~7日間往復振とう培養(100rpm)を行なう。

【0057】(スクリーニング用寒天培地: pH 7.0)

| | |
|--------------------------------------|---------|
| ラクトース | 0.20重量% |
| NaCl | 0.05重量% |
| K ₂ HPO ₄ | 0.10重量% |
| KH ₂ PO ₄ | 0.10重量% |
| NH ₄ NO ₃ | 0.20重量% |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.05重量% |
| 寒天 | 1.60重量% |

【0058】(スクリーニング用液体栄養培地: pH 7.0)

| | |
|--------------------------------------|---------|
| ラクトース | 1.0重量% |
| ポリペプトン | 1.0重量% |
| 酵母エキス | 0.10重量% |
| NaCl | 0.05重量% |
| K ₂ HPO ₄ | 0.10重量% |
| KH ₂ PO ₄ | 0.10重量% |
| NH ₄ NO ₃ | 0.20重量% |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.05重量% |

【0059】(2) ラクトースの酸化反応

次に、得られた培養液を粗酵素液とし、前記粗酵素液36μl、2重量%ラクトース溶液36μlおよび10重量%SDS溶液8μlを混合して、40℃で4時間反応させる。なお、糖を含む培地を使用するため、培養液そのものを以下の分析に供することにより、スクリーニングを行ってもよい。

【0060】(3) TLC分析

前記反応液の生成物をTLCにより分析し、ラクトースの酸化を確認する。

* 【0061】

【0062】(方法) 前記反応液約0.5μlをシリ

50

ジにより前記TLCプレートにスポットしてから、前記

(8)

13

展開溶媒で飽和された展開槽にいれ、前記展開溶媒を上昇させる。標準物質として、ラクトースおよびラクトビオン酸を同プレートにスポットする。そして、前記展開後、ドラフト内で完全に風乾させた前記プレートに、前記検出試薬Aまたは検出試薬Bを噴霧してから、110～120℃で5分間加熱して発色試験を行う。その結果、ラクトースと同じ移動度を示すスポットが減少または確認されず、かつラクトビオン酸と同じ移動度を示すスポットが確認されたものが、ラクトース酸化能陽性であり、その菌体がラクトビオン酸を生成する菌体と判断できる。前記展開溶媒を用いた場合のTLC分析において、ラクトースの移動度は、通常、Rf0.4～0.8の範囲であり、ラクトビオン酸の移動度は、Rf0.2～0.6の範囲である。なお、標準物質は、ラクトースおよびラクトビオン酸に限定されず、培地に使用した糖およびこれに対応するアルドン酸を使用すればよい。なお、基質を単糖とした場合、前記検出試薬Aではアルドン酸の検出が困難であるが、前記検出試薬Bによればこのようなアルドン酸も検出することができる。

【0063】また、例えば、前記TLC分析の前に、以下に示すβ-ガラクトシダーゼ活性欠失菌株の選定を行なってもよい。これにより、ラクトースを酸化する菌体から、β-ガラクトシダーゼ活性によってラクトースを加水分解する菌体を除去することができる。

【0064】(4) β-ガラクトシダーゼ活性欠失菌株の選定

前記スクリーニング用平板寒天培地上に、以下に示すX-GalのDMF溶液30μlを塗布してから菌体の培養液を塗布し、28℃で3日間静置培養する。この培地上では、β-ガラクトシダーゼ活性を有する菌体のコロニーは青色を呈し、前記活性を欠失した菌体のコロニーは白いままである。この白いコロニー菌体について、前述のようなTLC分析を行なう。

【0065】(X-GalのDMF溶液) 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド(X-Gal) 20mgを、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF) 1mlに溶解させる。

【0066】(5) HPLC分析

前記反応液の生成物をHPLCにより分析し、アルドン酸(ラクトビオン酸)生成を確認する。

【0067】(カラム)

Asahipak NH2P-50 (Shodex社製)

【0068】(溶離液)

アセトニトリル: 40mMクエン酸-NaH₂PO₄緩衝液(pH5.0)=60:40(体積比)

【0069】(条件)

温度: 40℃

流速: 0.8ml/min

検出器: 示差屈折計 (RID-6A: 島津製作

14

所社製)

【0070】(方法) 標準物質として、前記反応液と同じ濃度のラクトース溶液およびラクトビオン酸溶液を使用し、前記各標準物質と前記反応液とをそれぞれHPLCにより前記条件下で分析する。その結果、ラクトースと同じ溶出位置のピークが減少し、かつラクトビオン酸と同じ溶出位置のピークが確認されたサンプル(反応液)は、ラクトビオン酸の生成からアルドン酸生成酵素を産生する菌体と判断できる。なお、標準物質は、ラクトースおよびラクトビオン酸に限定されず、培地に使用した糖およびこれに対応するアルドン酸を使用すればよい。

【0071】以上に述べたスクリーニング方法により、本発明者らが土壌より分離した菌体が、前述のアシネトバクター バウマンニ No. 7W2-3 (FERM P-17631) およびブルクホルデリア セバシア No. 24-2-1 (FERM P-17632)、不完全菌類28-2株 (FERM P-18103)、不完全菌類KD-3株 (FERM P-18104) 等である。

【0072】前述のようなスクリーニングにおいて、例えば、以下に示すように、変異処理した菌体からスクリーニングを行なうこともできる。

【0073】(変異処理) 変異処理する菌株の菌体懸濁液100μlを、前記液体栄養培地に接種して28℃で2～7日間振とう培養を行い、対数増殖後期の菌体を得る。この培養液0.5mlを無菌的に集菌し、菌体を50mM酢酸緩衝液(pH6.0、以下同じ)で洗浄した後、100μg/mlのN,N'-ニトロソグアニジン(NTG)を含有する酢酸緩衝液0.5mlに懸濁し、30℃で5分～2時間処理する。NTG処理後、遠心分離して処理液を除去し、回収した菌体を滅菌した酢酸緩衝液で3回洗浄する。この菌体を前記液体栄養培地10mlに懸濁し、28℃で24時間振とう培養して変異株を発現させる。そして、この培養液を用いて、前述と同様にβ-ガラクトシダーゼ活性欠失菌株の選定およびTLC分析を行なう。

【0074】つぎに、本発明のアルドン酸生成酵素は、例えば、以下に示すように、本発明の新規菌体を培養し、好ましくはさらに精製することによって製造できる。

【0075】(1) 培養方法

本発明の新規菌体を前記スクリーニング用液体栄養培地を用いて、振とう培養する。培養温度は、例えば、25～40℃の範囲であり、培養時間は、例えば、24～180時間の範囲である。また、前記培地のpHは、例えば、pH5～8の範囲である。

【0076】アシネトバクター バウマンニ No. 7W2-3 (FERM P-17631) を使用する場合、その条件は、例えば、培養温度25～40℃の範

15

囲、培養時間24～180時間の範囲、培地のpH5～8の範囲である。

【0077】また、ブルクホルデリア セパシア No. 24-2-1 (FERM P-17632) を使用する場合、その培養条件は、例えば、培養温度25～40℃の範囲、培養時間24～180時間の範囲、培地のpH5～8の範囲である。

【0078】また、不完全菌類28-2株 (FERM P-18103)、KD-3株 (FERM P-18104) を使用する場合、その条件は、例えば、培養温度25～40℃の範囲、培養時間3～14日の範囲、培地のpH5～7の範囲である。

【0079】(2) 精製方法

前記培養液の菌体に含有されるアルドン酸生成酵素または菌体から分泌されたアルドン酸生成酵素を、常法により分離精製することによって、単一の酵素標品を得ることができる。アルドン酸生成酵素の精製は、例えば、既知の方法である、硫酸等による塩析法、等電点沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等の組み合わせにより行うことができる。また、この他に、Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) (製品名 Pharmacia FPLC™ System : アマシャムファルマシアバイオテック社製) 等も使用できる。以下に精製方法の一例を示す。

【0080】菌体内酵素の場合は、まず、前記培養液を遠心分離 (10,000rpm、30min、4℃) して菌体を回収する。前記菌体に緩衝液を添加して懸濁した後、菌体を破碎する。前記菌体の破碎方法としては、特に制限されず、例えば、摩砕用アルミナ等を用いた摩砕法、フレンチプレス等による高圧法、超音波処理法、酵素処理法、凍結融解法等があげられる。前記緩衝液としては、例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液等が使用できる。また、菌体外酵素の場合は、同様の遠心分離の条件により、培養液から菌体を除去して上清を回収し、後述する塩析処理を行えばよい。

【0081】前記破碎処理後、タンパク質の可溶化を行なう。前記可溶化は、例えば、塩化ナトリウムや塩化カリウム等の塩、EDTA等のキレート剤、水酸化カリウム等のアルカリ剤、界面活性剤等を添加することにより行なえる。界面活性剤を用いる場合、例えば、前記界面活性剤を可溶化処理溶液1ml当たり0.2～3.0重量%になるように添加して、2～10℃で、0.5～24時間処理すればよい。

【0082】そして、この処理溶液を遠心分離して上清*

$$C(\text{mg/ml}) = 0.0473 \times [(A2 - A1) - (A2_0 - A1_0)]$$

A1 : 1回目のサンプルの吸光度

(9)

16

*を回収し、塩析処理を行なう。例えば、前記上清に10～30%飽和になるように硫酸を添加し、充分に攪拌した後、この飽和溶液を遠心分離する。そして、得られた上清に、40～90%飽和となるように、再度、硫酸を添加して攪拌した後、前述と同様にして遠心分離を行い沈殿を回収する。そして、この沈殿を緩衝液に溶解し、同緩衝液により一晩透析を行う。前記緩衝液としては、特に制限されないが、例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液等が使用でき、そのpHは、pH4～8の範囲が好ましく、濃度は、10～100mMの範囲が好ましい。

【0083】前記透析後の酵素液を、各種カラムクロマトグラフィーに供する。例えば、前記透析に使用した緩衝液と同様の緩衝液で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに前記酵素液を添加し、0～500mMのNaClを含む前記緩衝液で溶出を行なう。そして、アルドン酸生成酵素の溶出画分を回収して、濃縮・透析した後、さらに他のクロマトグラフィーに供して分離することにより単一に精製することができる。使用するクロマトグラフィーの種類等は、特に制限されず、適宜組み合わせることができる。

【0084】本発明のアルドン酸生成酵素の力価は、例えば、以下に示す第1および第2の測定方法等により測定できる。

【0085】以下に示す第1の測定方法における力価は、pH6.0、40℃の条件下で、100mMのグルコースから、1分間に1μモルのグルコン酸を生成する酵素量を1Uとする。以下、この測定方法を、グルコン酸測定法という。

【0086】40℃に保温した200mM D-グルコース (50mM酢酸緩衝液: pH6.0) 500μlに、サンプル500μlを添加して、40℃で10分間インキュベートする。そして、1N NaOH 100μlおよび1N HCl 100μlを添加して反応を停止させる。この溶液を10,000rpmで10分間遠心分離して沈殿物を除去し、得られた上清のうち800μlに、下記試薬1 (400μl) と試薬2 (8μl) とを添加して混合する。そして、室温に5分間放置後、340nmにおける吸光度 (A1) を測定する。続いて、この反応液に下記試薬3 (5μl) を添加して、室温に20～30分間放置後、340nmにおける吸光度 (A2) を測定する。これらの吸光度 (A1およびA2) を下記式 (1) に代入して生成されるグルコン酸濃度を求め、さらに、下記式 (2) から力価を求めることができる。なお、ブランクとしては、酵素液 (サンプル) の代りに前記緩衝液を用いる。

【0087】

... (1)

A2 : 2回目のサンプルの吸光度

pH 5~7の範囲である。培養液のpHは、アルドン酸の生成に伴って低下するため、前記pHを一定の範囲に

(11)

19

保つために、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カルシウム等を添加することが好ましく、特に好ましくは炭酸カルシウムである。

【0101】培養温度は、例えば、20～35℃の範囲であり、好ましくは25～35℃の範囲、より好ましくは28～32℃の範囲である。培養時間は、例えば、1～14日間の範囲であり、好ましくは1～7日間の範囲、より好ましくは1～3日間の範囲である。

【0102】前記培養は、好気条件下で行なうことが好ましく、その培養形式は特に制限されないが、例えば、振とう培養、強制通気による深部培養等が採用できる。前記通気条件としては、一分間当たり培養液の液量に対して0.3～2倍量（体積）の空気を吹き込むことが好ましく、より好ましくは0.3～1.5倍量（体積）の範囲、特に好ましくは0.5～1.0倍量（体積）の範囲である。

【0103】前記回分培養法の場合は、例えば、対数増殖期後期になるまで培養した種培養菌体液を、前記液体培地に0.3～2.0重量%の範囲になるように接種して前記条件で培養を行なう。

【0104】この方法によれば、ラクトースを用いた場合、例えば、1～10日の培養により、80～100%の収率でラクトビオン酸を得ることができる。また、生成されたラクトビオン酸は、培養中に分解されることなく、その収率を維持できる。

【0105】また、前記流加培養方法の場合は、前述と同様にして培養を開始するが、さらに、培地中の糖含量をモニターし、所定の濃度に保つように前記糖を添加していく。培地中の前記糖濃度は、特に制限されないが、初期濃度よりも低い濃度で一定に保つことが好ましく、例えば、5～20重量%の範囲であり、好ましくは7～18重量%の範囲であり、より好ましくは10～15重量%の範囲である。なお、糖の添加は、継続的に行なってもよいし、複数回に分けて行なってもよい。

【0106】この流加培養方法によれば、基質が順次添加されるため、ラクトースを用いた場合、例えば、前記回分培養法に比べて、1～10日の培養により、0.2～0.5重量倍の範囲であるラクトビオン酸が得られ、より好ましくは0.3～0.5重量倍の範囲であり、特に好ましくは0.4～0.5重量倍の範囲である。この場合も、前述と同様に生成されたラクトビオン酸は分解されずにその収率が維持される。

【0107】このようにして生成したアルドン酸は、さらに、後述の精製方法によって前記培養液から単一精製して回収することにより、高純度のアルドン酸を得ることができる。

【0108】（第2のアルドン酸製造方法）本発明の菌体を、触媒として糖に直接接触させることにより（以下、「菌体反応」ともいう）、アルドン酸を製造できる。

20

【0109】まず、前述のような培養方法により培養した本発明の菌体を回収し、緩衝液または生理食塩水等で洗浄する。そして、遠心分離により再度菌体を回収し、この菌体を、前記糖を含む反応溶液に懸濁させて酸化反応を行う。反応後に、遠心分離や濾過によって菌体や沈殿物等を除去することによりアルドン酸が得られる。この方法によれば、例えば、菌体の生育に必要な種々栄養源を添加する必要が無く、菌体の分離も容易であるため、反応させるだけで高純度のアルドン酸を得ることができる。また、後述の精製方法により、さらにアルドン酸の精製を行なってもよい。

【0110】前記反応溶液中の糖の濃度は、例えば、5～20重量%の範囲であり、好ましくは7～18重量%の範囲、より好ましくは10～15重量%の範囲である。前記糖に対する菌体量（湿重量）は、前記糖1g当たり0.05～1gの範囲が好ましく、より好ましくは0.1～0.5gの範囲、特に好ましくは0.1～0.3gの範囲である。また、本発明の乾燥菌体を使用してもよい。

【0111】反応温度は、例えば、20～50℃の範囲であり、好ましくは25～45℃の範囲、より好ましくは30～40℃の範囲である。反応時間は、例えば、24～250時間の範囲であり、好ましくは24～200時間の範囲、より好ましくは24～100時間の範囲である。前記反応液のpHは、pH4～8の範囲が好ましく、より好ましくはpH5～7の範囲、特に好ましくはpH5.5～7の範囲である。この反応は、緩衝液中で行なうことが好ましく、例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液等の緩衝液が使用できる。この反応は、攪拌しながら好氣的に行なうことが好ましい。例えば、100～250rpmの速度で攪拌することが好ましく、1分間当たり反応液量に対して0.3～2倍量（体積）の空気を吹き込むことが好ましい。

【0112】前記反応液に、前述のような金属、金属塩等を含有させることにより、各種アルドン酸塩を得ることも可能である。さらに、pHを一定に保ち、一回の菌体反応により同時に金属塩を生成させるために、例えば、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム等を含有させてもよい。

【0113】（第3のアルドン酸製造方法）前述と同様にして回収した本発明の菌体を固定化した固定化菌体を調製し、前記固定化菌体に糖を直接接触させることにより、アルドン酸を製造できる。

【0114】前記固定化菌体は、公知の方法により調製でき、例えば、アルギン酸カルシウム、多孔性ガラスビーズ等の不溶性担体に菌体を結合させる方法や、k-カラギーナン等の高分子ポリマーで菌体を包み込んだり、これにより菌体を被覆する包括方法等が採用できる。

【0115】例えば、カラムに前記固定化菌体を充填

(12)

21

し、糖溶液を通液することにより行なえる。カラムを通過した糖溶液は、再度カラムに戻し、糖溶液中の糖を充分にアルドン酸に変換するまで循環させることが好ましい。前記糖溶液の濃度は、特に制限されないが、例えば、5～20重量%の範囲であり、好ましくは7～18重量%の範囲であり、より好ましくは10～15重量%の範囲である。糖を溶解する溶媒としては、例えば、水や、前述の緩衝液等が使用できる。前記糖溶液の流速は、例えば、 $\phi 3.5 \times 42 \text{ cm}$ のカラムを使用する場合、0.2～2 ml/分の範囲であり、好ましくは0.3～1.5 ml/分の範囲であり、より好ましくは0.5～1.0 ml/分の範囲である。この反応は、前記第2のアルドン酸製造方法と同様の条件で行なうことができる。

【0116】(第4のアルドン酸製造方法)本発明の酵素を糖に直接接触させることにより、アルドン酸を製造できる。なお、前記酵素は、単一精製酵素でも、粗酵素(部分精製酵素)であってもよい。

【0117】反応条件は、菌体の代りに酵素を使用する以外は、前記第2のアルドン酸製造方法と同様に行なうことができる。反応液中の糖に対する酵素量は、前記糖1 g当たり1～20 Uの範囲が好ましく、より好ましくは3～18 Uの範囲、特に好ましくは5～15 Uの範囲である。

【0118】(第5のアルドン酸製造方法)本発明の酵素を固定化した固定化酵素を調製し、前記固定化酵素に糖を直接接触させることにより、アルドン酸を製造できる。

【0119】この反応は、前記第3のアルドン酸製造方法と同様に行なうことができ、前記固定化酵素の調製も、前記固定化菌体の調製方法と同様である。

【0120】以上のような本発明の各種アルドン酸製造方法により生成したアルドン酸は、さらに、以下に示す方法等により精製してもよい。

【0121】まず、前記培養液または反応液等を遠心分離することにより、培養液・反応液中の菌体や沈殿物等の固形分を除去し、上清を回収する。

【0122】つぎに、前記上清を活性炭処理する。例えば、基質である糖がラクトース等の二糖またはそれ以上の多糖である場合は、未反応の基質が前記活性炭に吸着されるため、これらを除去できる。さらに、培地成分由来の色素、臭気等も除去できるため、精製工程の低コスト化も可能である。前記活性炭処理の方法は特に制限されず、例えば、バッチ法でもカラム法でもよい。前記活性炭の使用割合は、例えば、上清1 ml当たり0.001～1 gの範囲である。

【0123】また、前記上清をイオン交換クロマトグラフィーに供して未反応基質等を除去してもよい。前記イオン交換樹脂としては、陰イオン交換樹脂が好ましく、例えば、製品名DIAION PA-406S(三菱化

22

成工業社製)等が使用できる。前記上清をカラムに供し、前記生成物(アルドン酸)のみを前記陰イオン交換樹脂吸着させ、前記樹脂を洗浄した後、酸溶液により前記生成物を溶出することができる。前記カラムの平衡化および洗浄に用いる溶液としては、グリシン塩酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の緩衝液や希酸溶液等が好ましく、そのpHは、pH 2～6の範囲が好ましい。

【0124】そして、前記活性炭処理または前記イオン交換樹脂の処理によって得られた溶液を濃縮・乾固することにより、高純度のアルドン酸を得ることができる。

【0125】さらに高純度のアルドン酸を得る場合には、前記活性炭またはイオン交換樹脂等による処理後の溶液を濃縮してから、冷却してアルドン酸の結晶を析出させてもよい。前記濃縮は、例えば、減圧濃縮、限外濾過(膜濾過)等により行なえる。

【0126】この他にも、アルコール等の有機溶媒を添加することにより、アルドン酸を沈殿させて回収する方法等も適用できる。このようなアルコール沈殿を行なう場合は、前記処理後の溶液に、例えば、エタノールを50～80体積%の範囲になるように添加し、これを遠心分離または濾過することにより沈殿を回収する。そして、前記沈殿を80体積%エタノールで洗浄後、少量の水に溶解し、これを凍結乾燥すればよい。

【0127】なお、これらの精製工程は、適宜組み合わせで行なうことができる。

【0128】

【実施例】(実施例1)この実施例は、本発明の菌体を用いた発酵法により、ラクトビオン酸を製造した例である。使用した菌体、培地および方法を以下に示す。

【0129】(使用菌体)

アシネトバクター バウマンニ No. 7W2-3 (FERM P-17631)

ブルクホルデリア セバシア No. 24-2-1 (FERM P-17632)

【0130】(種培養培地)

| | |
|--------------------------------------|----------|
| ラクトース | 1.0 重量% |
| ポリペプトン | 1.0 重量% |
| 酵母エキス | 0.1 重量% |
| NaCl | 0.05 重量% |
| K ₂ HPO ₄ | 0.10 重量% |
| NH ₄ NO ₃ | 0.20 重量% |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 0.05 重量% |

【0131】(本培養培地)

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| ラクトース | 10～20 重量% |
| ポリペプトン | 5.0 重量% |
| 酵母エキス | 0.1 重量% |
| NaCl | 0.05 重量% |
| K ₂ HPO ₄ | 0.10 重量% |
| NH ₄ NO ₃ | 0.20 重量% |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 0.05 重量% |

(13)

23

CaCO₃

3. 5 重量%

【0132】各菌体を、試験管(φ18×180mm)中の前記種培養培地10mlに白金耳植菌し、30℃で3日間往復振とう培養して種培養を行なった。これらの種培養1mlを、3種類のラクトース濃度(10重量%、15重量%、20重量%)に調製した前記本培養培地100ml(500ml容量坂口フラスコ)にそれぞれ接種し、30℃で約10日間往復振とう培養を行なった。前記各培養液から、所定の培養時間毎(0、20、44、71、95、119、143、167、239時間)にサンプリングを行ない、そのサンプル(培養液)を遠心分離(10,000rpm、15分間、4℃)して上清を回収した。これらの前記上清について、前述の条件によりラクトビオン酸のHPLC分析を行なった。これらの結果を図1に示す。同図(a)は、培地中のラクトース濃度が10重量%の場合におけるラクトビオン酸収率の経時変化を示すグラフであり、同図(b)は、前記ラクトース濃度15重量%の場合におけるラクトビオン酸収率の経時変化を示すグラフであり、図(c)は、培地中のラクトース濃度が20重量%の場合におけるラクトビオン酸収率の経時変化を示すグラフである。

【0133】また、ブルクホルデリア セバシア No. 24-2-1(FERM P-17632)を前述と同様にして培養し、培養液中のラクトース濃度およびラクトビオン酸濃度の経時変化をHPLCにより測定した結果を図2のグラフに示す。

【0134】図1(a)～(c)に示すように、本発明の両菌体を各濃度のラクトースを含有する培地で生育させた結果、前記ラクトースは完全にラクトビオン酸に変換されたこと、ラクトビオン酸濃度が減少しないことから生成されたラクトビオン酸は分解されていないことが確認できた。また、図2に示すように、ラクトースの減少とラクトビオン酸の増加は、反比例の関係にあることも確認できた。

【0135】(実施例2)この実施例は、発酵法によりラクトビオン酸を製造し、その精製を行なった例である。

【0136】ブルクホルデリア セバシア No. 24-2-1(FERM P-17632)を、試験管(φ18×180mm)中の前記種培養培地10mlに白金耳植菌し、30℃で3日間往復振とう培養して種培養を行なった。この種培養1mlをラクトース濃度20重量%の前記本培養培地100ml(500ml容量坂口フラスコ)に接種し、30℃で4日間往復振とう培養を行なった。この培養液から、所定の培養時間毎にサンプリングを行ない、そのサンプル(培養液)から、前記実施例1と同様にして上清を回収した。これらの上清について、前述と同様にしてHPLC分析を行なった。

【0137】HPLC分析の結果、ラクトースの溶出ピークは検出されず、前記実施例1の結果と同様に、ラクトースは完全に酸化されてラクトビオン酸が生成された

24

ことが確認できた。

【0138】続いて、前記上清(約100ml)をエバポレーターにより1/5体積量になるまで濃縮した。前記濃縮液を、脱イオン水で平衡化した活性炭カラム(φ3×10cm)に供し、脱イオン水50mlにより通過(溶出)させ回収した。回収した通過液を、再度、1/20体積量になるまで濃縮し、これにエタノール濃度70体積%になるように2.3倍量(体積)エタノールを添加した後、生成した沈殿物を遠心分離(10,000rpm、15分、4℃)により回収した。この沈殿物を70体積%エタノールで洗浄した後、再度、遠心分離して沈殿を回収し、前記沈殿を少量の脱イオン水に溶解させた。この溶液を凍結乾燥することによって、ラクトビオン酸カルシウム21.2gが得られた。この精製されたラクトビオン酸カルシウムについて、前述と同様にHPLC分析を行なった。この結果を、図3のクロマトグラムに示す。

【0139】この結果、同図に示すように、ラクトビオン酸の溶出ピーク(A)以外に溶出ピークは検出されず、高純度であることが確認された。なお、図中のピーク(B)は、試料の溶媒として用いた水のピークであり不純物ではない。

【0140】また、前記ラクトビオン酸を、¹³C-NMRにより分析した結果、標準品のラクトビオン酸とシグナルが一致し、質量分析によれば、その分子量は357であった。また、赤外線吸収スペクトル(IR)分析を行なった結果、標準品のラクトビオン酸と同様に、カルボキシル基を有することが確認された。

【0141】(実施例3)この実施例は、菌体反応によりラクトビオン酸を製造した例である。

【0142】前記実施例2と同様にして培養したブルクホルデリア セバシア No. 24-2-1(FERM P-17632)を、0.75重量% NaCl溶液(以下、同じ)で十分に洗浄した後、再度回収して湿重量約150gの菌体を得た。そして、ラクトース100gと16.5重量% CaCO₃溶液1000mlとの混合液(滅菌済み)に、前記菌体を懸濁して5000mlの反応液とした。なお、前記反応液において、ラクトースの初期濃度20重量%、菌体力価3.0U/ml、pH6.7になるように設定した。この反応液を、攪拌・通気(1分当たり反応液の0.5倍体積量の空気を吹き込む)しながら、30℃で2日間反応させた。そして、前記反応液を遠心分離(10,000rpm、30分間、4℃)してCaCO₃を除去した後、得られた上清を、脱イオン水で平衡化した活性炭カラム(φ5×40cm)に供し、脱イオン水1500mlにより通過(溶出)させた。回収した通過液を、減圧濃縮して凍結乾燥することによって、ラクトビオン酸カルシウム1040gが得られた。

【0143】このラクトビオン酸を、前述と同様にして

(14)

25

HPLC分析を行なった結果、前記実施例2と同様に不純物の溶出ピークは検出されず、高純度のラクトビオン酸であることが確認された。

【0144】(実施例4)この実施例は、固定化菌体を用いてラクトビオン酸を製造した例である。

【0145】前記実施例3と同様にして得られた洗浄菌体(湿重量約50g)を、前記NaCl溶液に懸濁して1000mlとした。そして、この菌体懸濁液と4重量%アルギン酸ナトリウム溶液100mlとを混合し、この混合液に50mM CaCl₂を含む20mMリン酸緩衝液(pH6.5)1000mlを滴下して、攪拌しながら約4℃で一晩放置した。この溶液を遠心分離することにより、前記菌体を含むアルギン酸ナトリウムビーズを回収し、これを固定化菌体とした。前記固定化菌体150gをカラム(φ3×30cm)に充填し、このカラムに300mM CaCl₂を含む20重量%ラクトース溶液(加圧滅菌済み)100mlを通過させた。なお、前記通過液は、前記通過液に含まれるラクトース、ラクトビオン酸および単糖の量を、前述のようにHPLCによって分析・測定し、前記通過液中のラクトースがなくなるまで前記カラムに循環させた。この反応条件は、流速0.5ml/分、温度30℃である。反応終了後、前記実施例3と同様の処理を行なうことにより、ラクトビオン酸カルシウム20.3gが得られた。

【0146】このラクトビオン酸について、前述と同様にしてHPLC分析を行なった結果、不純物の溶出ピークは検出されず、高純度のラクトビオン酸であることが確認できた。また、単糖は検出されず、ラクトースやラクトビオン酸が分解されていないことも確認できた。

【0147】(実施例5)この実施例は、本発明の新規菌体を用いて、各種糖からそれぞれに対応するアルドンを生成させた例である。

【0148】基質である糖として、グルコース、マルトース、マンノース、ガラクトース、D-リボース、D-*

(本培養培地)

ラクトース
ポリペプトン
NaCl
K₂HPO₄
NH₄NO₃
MgSO₄・7H₂O
CaCO₃

【0155】前記各菌体を、前記種培養液培地に一白金耳植菌し、30℃で5日間、振とう培養により種培養を行い、得られた種培養液を、前記本培養培地の1体積%となるように植菌して30℃で振とう培養を行った。本培養は、28-2株について10日間、KD-3株について14日間行った。なお、培地のpHは、pH6~7とした。そして、得られた培養液を遠心分離(15、

26

*キシロース、L-アラビノースをそれぞれ用いた以外は、前記実施例1と同様にして前記各菌体を培養した。そして、培養液36μl、2重量%前記糖溶液36μlおよび10重量%SDS溶液8μlを混合して、それぞれ40℃で4時間反応させた後、これらの反応液について、前述と同様にしてHPLC分析およびTLC分析を行なった。

【0149】この結果、基質の減少およびそれらに対応するアルドンの生成が確認された。なお、オリゴ糖の基質が加水分解されているかを併せて確認したが、加水分解は見られなかった。

【0150】(実施例6)ラクトースの代りにグルコースおよびマルトースをそれぞれ用いた以外は、前記実施例1と同様にして、ブルクホルデリア セパシア No. 24-2-1(FERM P-17632)を2日間、30℃で培養し、各培養液についてHPLC分析を行なった。

【0151】この結果、培養1日後にはグルコースはグルコン酸に、マルトースはマルトビオン酸に完全に変換された。

【0152】(実施例7)本発明の不完全菌類28-2株(FERM P-18103)およびKD-3株(FERM P-18104)を培養して、それぞれの菌体由来のアルドンを生成酵素を調製し、ラクトビオン酸の生成を確認した。以下に、使用した培地、培養条件、測定方法等を示す。

【0153】(種培養培地)

| | |
|--------------------------------------|----------|
| ラクトース | 1.0 重量% |
| ポリペプトン | 1.0 重量% |
| NaCl | 0.05 重量% |
| K ₂ HPO ₄ | 0.10 重量% |
| NH ₄ NO ₃ | 0.20 重量% |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 0.05 重量% |

【0154】

| |
|-----------|
| 1~10 重量% |
| 1~5 重量% |
| 0.05 重量% |
| 0.10 重量% |
| 0.20 重量% |
| 0.05 重量% |
| 0.3~3 重量% |

(ラクトースの1/2モル量)

000G、15分)して培養液上清を回収し、これを粗酵素液として、下記精製工程に供した。

【0156】前記粗酵素液に、80~90%飽和となるように硫酸を添加して溶解させ、2時間放置した後、遠心分離して塩析物を回収し、この塩析物を、10mM酢酸緩衝液(pH5.5)に溶解した。これをさらに限外濾過法により、脱塩・濃縮したものを酵素液とした。

(15)

27

【0157】所定濃度（2、20、40、50重量%）のラクトース溶液100 μ Lに前記酵素液100 μ Lを加え、さらに添加したラクトースの0.5モル量に相当する炭酸カルシウムを加えて、40℃で4日間反応させた。そして、二日目および四日目の反応溶液について、前述のようにしてTLC分析を行った。なお、反応開始時における反応溶液中のラクトース濃度は、1、10、20、25重量%であり、ラクトース濃度1重量%に対して炭酸カルシウム0.146重量%の割合となる。

【0158】TLC分析の結果、各菌株由来の酵素反応によって、それぞれ基質の減少およびラクチオン酸の生成が確認された。

【0159】（実施例8）本発明の新規菌株28-2株（FERM P-18103）およびKD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素の至適pHを調べた、なお、酵素液としては、前記実施例7で調製したものを使用した。

【0160】所定pH（pH2.32およびpH3.0～pH10.5まで0.5きざみ）の緩衝液を準備した。pH2.32～pH8.0の緩衝液としては、0.2MNa₂HPO₄および0.1Mクエン酸から調製されるマッキルペインの緩衝液（McIlvaine's buffer solution）を使用し、pH7.5～10.5の緩衝液としては、0.2M H₃BO₃を含む0.2M KClおよび0.2M Na₂CO₃から調製される緩衝液を使用した。

【0161】そして、前記各種緩衝液を用いて、前述のグルコン酸測定法により吸光度測定を行った。各緩衝液を用いた場合の吸光度変化を求め、最も高い値を「100%」とした場合の相対活性を求めた。これらの結果を図4および5に示す。図4は、28-2株（FERM P-18103）由来のアルドン酸生成酵素のpH-活性曲線を示すグラフであり、図5は、KD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素のpH-活性曲線を示すグラフである。

【0162】（実施例9）本発明の新規菌株28-2株（FERM P-18103）およびKD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素のpH安定性を調べた。

【0163】酵素液としては、前記実施例7で調製したものを使用し、緩衝液は、前記実施例8と同じ緩衝液を使用した。まず、酵素反応前に、前記酵素液30 μ Lおよび緩衝液30 μ Lを混合し、20時間、4℃でインキュベートした後、この混合液25 μ Lに0.1M酢酸緩衝液（pH5.5）475 μ Lを添加して、これをサンプルとした。なお、この希釈によってサンプルのpHは、pH5.5に調整された。続いて、このサンプルを用いて、前記POD測定法により吸光度変化の測定を行った。そして、pH処理を行っていない酵素液を同じ倍率に希釈し、同様にして測定した場合の吸光度変化を

28

「100%」として、残存活性（%）を求めた。これらの結果を図6および7に示す。図6は、28-2株（FERM P-18103）由来のアルドン酸生成酵素のpH安定性を示すグラフであり、図7は、KD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素のpH安定性を示すグラフである。

【0164】（実施例10）本発明の新規菌株28-2株（FERM P-18103）およびKD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素の至適温度を調べた。

【0165】所定の温度（20℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、70℃、80℃）で酵素反応を行い、緩衝液として酢酸緩衝液（pH5.5）を使用した以外は、前記実施例8と同様にしてグルコン酸測定法により吸光度変化の測定を行った。そして、各温度での吸光度変化を求め、最も高い値を「100%」とした場合の相対活性を求めた。これらの結果を図8および9に示す。図8は、28-2株（FERM P-18103）由来のアルドン酸生成酵素の温度-活性曲線を示すグラフであり、図9は、KD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素の温度-活性曲線を示すグラフである。

【0166】（実施例11）本発明の新規菌株28-2株（FERM P-18103）およびKD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素の熱安定性を調べた。

【0167】酵素を所定温度（10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、65℃、70℃）でプレインキュベートした後、冷却してから、酵素反応に供する以外は前記実施例9と同様にしてPOD測定法により吸光度測定を行った。そして、未処理の酵素液を用いて測定した場合の吸光度を「100%」として、残存活性（%）を求めた。これらの結果を図10および11に示す。図10は、28-2株（FERM P-18103）由来のアルドン酸生成酵素の熱安定性を示すグラフであり、図11は、KD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素の熱安定性を示すグラフである。

【0168】実施例8から実施例11の結果、28-2株（FERM P-18103）由来のアルドン酸生成酵素は、至適pHが6～8の範囲であり、特にpH6.1～3.5の範囲で優れた活性を示し、また、pH5～7.5の範囲でほぼ安定な活性を示した（pH安定性）。至適温度は、46～62℃の範囲で98%以上の相対活性を示し、特に58℃において最も高い活性を示した。また、60℃の熱処理で残存活性86%と高い熱安定性を示した。

【0169】また、KD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素は、至適pHが5～8の範囲であり、特にpH5.7において優れた活性を示

(16)

29

し、また、pH 3.6～10.5の範囲でほぼ安定な活性を示した（pH安定性）。至適温度は、45～58℃の範囲で98%以上の相対活性を示し、特に46℃において最も高い活性を示した。また、60℃の熱処理で残存活性100%と高い熱安定性を示した。

【0170】（実施例12）本発明の新規菌体28-2株（FERM P-18103）およびKD-3株（FERM P-18104）由来のアルドン酸生成酵素の基質特異性を調べた。試料として前記実施例7で調製した各酵素を使用した。以下に試薬、基質溶液および測定方法を示す。

【0171】（基質溶液）基質としては、ラクトース、L-アラビノース、D-グルコース、D-ガラクトース、D-キシロース、セルビオース、マルトース、マル*

（表1）

| | 相対活性 (%) | |
|-----------|----------|-------|
| | 28-2株 | KD-3株 |
| ラクトース | 100 | 100 |
| L-アラビノース | 5 | 46 |
| D-グルコース | 46 | 212 |
| D-ガラクトース | 32 | 71 |
| D-キシロース | 85 | 248 |
| セルビオース | 100 | 180 |
| マルトース | 51 | 139 |
| マルトトリオース | 60 | 202 |
| マルトテトラオース | 40 | 243 |
| マルトペンタオース | 40 | 163 |

【0174】このように、本発明の不完全菌類由来のアルドン酸生成酵素は、各種糖を基質として利用でき、特に28-2株由来のアルドン酸生成酵素は、ラクトースおよびセルビオースに対する高い活性を示した。また、KD-3株由来のアルドン酸生成酵素は、D-グルコース、D-キシロース、マルトトリオースおよびマルトテトラオースに対して極めて高い活性を示した。

【0175】

30

* トトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースを使用し、0.1M 酢酸緩衝液（pH 5.5）に10重量%となるように溶解して基質溶液を調製した。

【0172】（測定方法）10重量%の各種基質溶液500μLに、0.08重量% 4-アミノアンチピリン40μL、5重量%フェノール20μLおよび20U/mL POD（東洋紡社製）100μLを混合して、波長505nmにおける吸光度を測定した。吸光度が一定になった後、さらに酵素液500μLを加え、505nmにおける吸光度の増加を15秒～30秒毎に測定した。基質としてラクトースを使用した場合の反応速度を100として相対活性を求め、これを基質特異性として評価した。この結果を下記表1に示す。

【0173】

※【発明の効果】以上のように、本発明の新規菌体は、ヘミアセタール水酸基を有する糖の前記水酸基を特異的に酸化する。このため、前記菌体またはそのアルドン酸生成酵素によれば、各種アルドン酸を容易に製造することができる。

【0176】

【配列表】

※

SEQUENCE LISTING

<110> TAKEHARA KAGAKU KOGYO CO., LTD.

OSAKA CITY

<120> NOVEL ALDONIC ACID - PRODUCING FUNGI AND ENZYME THEREOF

<130> R4781

40

<140>

<141>

<150> JP P1999-369714

<151> 1999-12-27

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1745

<212> DNA

<213> Deuteromycetes

50

(17)

31

32

<220>

<221> rRNA

<222> (1).. (1745)

<223> 18S rRNA

<400> 1

```

tcatatgctt gtttcaaaga ttaagccatg catgtctaag tataagcaat tatacacgca 60
aactgcgaat ggctcattaa atcagttatc gtttatttga tggtagccta ctacatggat 120
aaccgtggta attctagagc taatacatgc taaaaacccc gacttcggaa ggggtgtgtt 180
tattagatta aaaaccaatg cccttcgggg ctcactggtg attcatgata acctctcgaa 240
ccgcatggcc ttgcgccggc ggtggttcat tcaaatttct gccctatcaa ctttcgatgg 300
ctgggtcttg gccagccatg gtgacaacgg gtaacggagg gttagggtc gaccccgag 360
aagaagcatg agaatcggct tctacatcca aggaaggcag caggcgcgca aattacacaa 420
tggcaactcg ccgatgtagt gacgaacaat accgatgcag ggctctttt ggtcttgcaa 480
ttggaatgag tacaatttaa atcccttaac gaggaacaat tggagggcaa gtctggtgcc 540
agcagccgcg gtaattccag ctccaatagc gtatatataa gttgttgca ttaaaaagct 600
cgtagttgaa ccttgggcct ggctggccgg tccgcctcac cgcgtgcaat ggtccggccg 660
ggcctttccc tctggggaac cgcattgctt tcaactggcg tgctggggaa ccaggacttt 720
tactttgaaa aaattagagt gttcaaagca ggcctatgct cgaatacatt agcatggaat 780
aatagaatag gacgtgcggt tctattttgt tggtttctag gaccgccgta atgattaata 840
gggacagtgc ggggcatcag tattcaattg tcagaggtag aattcttga tctattgaag 900
actaactact gcgaaagcat ttgccaagga tgttttcatt aatcaggaac gaaagttagg 960
ggatcgaaga cgatcagata ccgtcgtagt cttaccata aactatgccg actagggatc 1020
ggacgatgtt attttttgac tcgttcggca ccttacacga aagtacaagt ttctgggttc 1080
tggggggagt atggtcgcaa ggctgaaact taaagaaatt gacggaaggg caccaccagg 1140
agtggagcct gcggcttaat ttgactcaac acggggaaac tcaccaggtc cagacacgat 1200
gaggattgac agattgagag ctctttcttg atttcgtggg tggtagtgca tggccgttct 1260
tagttggtgg agtgatttgt ctgcttaatt gcgataacga acgagacctt aacctgctaa 1320
atagcccgtg ttgctttggc agtacgccgg ctctttagag ggactatcgg ctcaagccga 1380
tggaaagttg aggcaataac aggtctgtga tggccttaga tgttctgggc cgcacgcgcg 1440
ttacactgac agagccagcg agtccttcct tggccgaaag gcccgggtaa tcttggttaa 1500
ctctgtctgt ctggggatag agcattgcaa ttattgctct tcaacgagga attcctagta 1560
agcgcaagtc atcaacttgt gctgattacg tccctgccct ttgtacacac cgcccgtcgc 1620
tactaccgat tgaatggctc agtgaggcct tcggactggc ccagagaggt gggcaactac 1680
cactcaggcg ccggaaggtt gtacgaactc ggtcatttag aggaagtaaa agtcgtaaca 1740
aggctc

```

<210> 2

<211> 537

<212> DNA

<213> Deuteromycetes

<220>

40

<221> rRNA

<222> (1).. (32)

<223> 18S rRNA gene 3' end

<220>

<221> misc_feature

<222> (33).. (195)

<223> internal transcribed spacer 1. ITS1

<220>

<221> rRNA

<222> (196).. (353)

50

(18)

33

34

<223> 5.8S rRNA gene

<220>

<221> misc_feature

<222> (354).. (499)

<223> internal transcribed spacer 2, ITS2

<220>

<221> rRNA

<222> (500).. (537)

<223> 28S rRNA gene 5' end

<400> 2

10

tctccgttgg tgaaccagcg gagggatcat tacgagagtg tcaccactcc caaccactg 60
 ttacctaacc cgtccaccgt gcttcggcag gcagtcctgt gggacagggc ctcgcccccg 120
 cgaggggggtg cctgccgctg gccaacaaaa aattctagct gttttgtac catctgagtc 180
 ttccacaaat aaacaaaact ttcaacaacg gatctcttgg ttctggcatc gatgaagaac 240
 gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa 300
 cgcacattgc gccactagt attctggtgg gcagtcctgt tcgagcgtca ttcaaccct 360
 caagcctggc ttggtgttgg ggctctgcgt ctgcagtcce ttaaattccag tggcggacac 420
 gctaggtctc cgagcgagct agtttctcct cgctcagggc gtccggcgtg ggcttgccctc 480
 gcacccatct tttacaaggt tgacctcgga tcaggtagga ataccgctg aacttaa 537

<210> 3

20

<211> 1731

<212> DNA

<213> Deuteromycetes

<220>

<221> rRNA

<222> (1).. (1731)

<223> 18S rRNA

<400> 3

aaagattaag ccatgcatgt ctaagtataa gcaattatac cgtgaaactg cgaatggctc 60
 attaaatcag ttatcgttta ttgatagta ccttactact tggataaccg tggtaattct 120
 agagctaata catgctaaaa accccaactt cgggaggggt gtatttatta gataaaaaac 180
 caatgccctt cggggctcct tggtgattca tgataacttc tcagatcgca tggctttacg 240
 ccggcgacgg ttcatcaaaa ttctgccct atcaactttc gatggtaagg tattggctta 300
 ccatggtttc aacgggtaac ggggaattag ggttcgattc cggagagggg gcctgagaaa 360
 cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgcaatta cccaattccg atacggagag 420
 gtagtgacaa taaatactga tacagggctc ttttgggtct tgtaattgga atgagtacaa 480
 tttaaacctc ttaacgagga acaattggag ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat 540
 tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagttaaa aagctcgtag ttgaaccttt 600
 ggcttggtcg gcaggtccgc ctaccgcgt gcaattgtcc ggccgggcct tttcttctgg 660
 agaaccgcat gcccttcaact ggggtgtgtt gggaccagga cttttacttt gaaaaaatta 720
 gagtgttcaa agcaggcctt tgctcgaata cgtagcatg gaataataga ataggacgtg 780
 cggtcctatt ttgttggttt ctaggaccgc cgtaatgatt aatagggaca gtcgggggca 840
 tcagtattca attgtcagag gtgaaattct tggatttatt gaagactaac tactgcgaaa 900
 gcatttgcca aggatgtttt cattaatcag tgaacgaaag ttaggggatc gaagacgac 960
 ugataccgic glagtcttaa ccataaacta tgccgactag ggatcggggc gtgtlclat 1020
 tgtgaccgcg tcggcacctt acgagaaatc aaagtgtttg ggttctgggg ggagtattgt 1080
 cgcgaaggctg aaacttaaa gaaatgacgg aagggcacca ccaggcgtgg agcctgcggc 1140
 ttaatttgac tcaacacggg gaaactcacc aggtccagat gaaataugga ttgacagatt 1200
 gagagctctt tcttgatttt tcaggtgtgt gtgcatggcc gttcttagtt cgtgggggtga 1260
 cttgtctgct taattgcgat aacgaacgag accttcacct gctaaatagc caggctagct 1320

(19)

```

35                               36
ttggctggtc gccggcttct tagagggact atcggtctcaa gccgatggaa gtiggaggca 1380
ataacaggtc tgtgatgccc ttagatgttc tgggccgcac gcgcgtaca ctgacagagc 1440
caacgagttc tttcccttgg ccggaaggtc tgggtaatct tgttaaactc tgtcgtgctg 1500
gggtagagc attgcaatta ttgctcttca acgaggaatg cctagtaagc gcgtgtcatc 1560
agcacgcgtt gattacgtcc ctgcccttgg tacacaccgc ccgtcgctac taccgattga 1620
atggctcagt gaggccttcg gactggctcg aggaggttgg caacgaccac ctcaagccgg 1680
aaagtggtc aaactcggtc atttagagga agtaaaagtc gtaacaaggt t          1731
<210> 4
<211> 578
<212> DNA                               10
<213> Deuteromycetes
<220>
<221> rRNA
<222> (1).. (32)
<223> 18S rRNA gene 3' end
<220>
<221> misc_feature
<222> (33).. (214)
<223> internal transcribed spacer 1, ITS1
<220>                               20
<221> rRNA
<222> (215).. (339)
<223> 5.8S rRNA gene
<220>
<221> misc_feature
<222> (340).. (540)
<223> internal transcribed spacer 2, ITS2
<220>
<221> rRNA
<222> (541).. (578)                   30
<223> 28S rRNA gene 5' end
<400> 4
tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tatctattcc atgaggtgcg gtagcggcct 60
ccggcgtctt ctgccgggt gtaggggta acaccctcac gctccgcatg tctatatcct 120
ttttttacga gcacctttcg ttctccttcg gtggggcaac ctgccgttgg aactatcaaa 180
actcttttgc atctagcatt acctgttctg atacaaacaa tcgttacaac tttaacaat 240
ggatctcttg gctctggcat cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt agtgtgaatt 300
gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga acgcacattg cggcccttgg tattccatgg 360
ggcatgcctg ttcgagcgtc atctacacc tcaagctctg ctgtgtgttg ggcgtctgtc 420
ccgcctctgc gcgcggactc gcccacaaatt catlggcagc ggtccttgcc tcctctcgcg 480
cagcacattt gcgtttctcg aggtgcgagg cccgcgtcca cgaagcaaca ttaccagtct 540
ttgacctcgg atcaggtagg gatacccgct gaacttaa          578

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施例において、本発明の新規菌体によるラクトビオン酸の生成を経時的に測定した結果を示すグラフである。

【図2】 前記実施例において、本発明の新規菌体によるラクトビオン酸の増加とラクトースの減少とを経時的に測定した結果を示すグラフである。

【図3】 本発明のその他の実施例において、精製した

アルドン酸をHPLCで分析した結果を示すチャート図である。

【図4】 本発明のさらにその他の実施例において、本発明のアルドン酸生成酵素の至適pHを測定した結果を示すグラフである。

【図5】 本発明のさらにその他の実施例において、本発明のアルドン酸生成酵素の至適pHを測定した結果を示すグラフである。

(20)

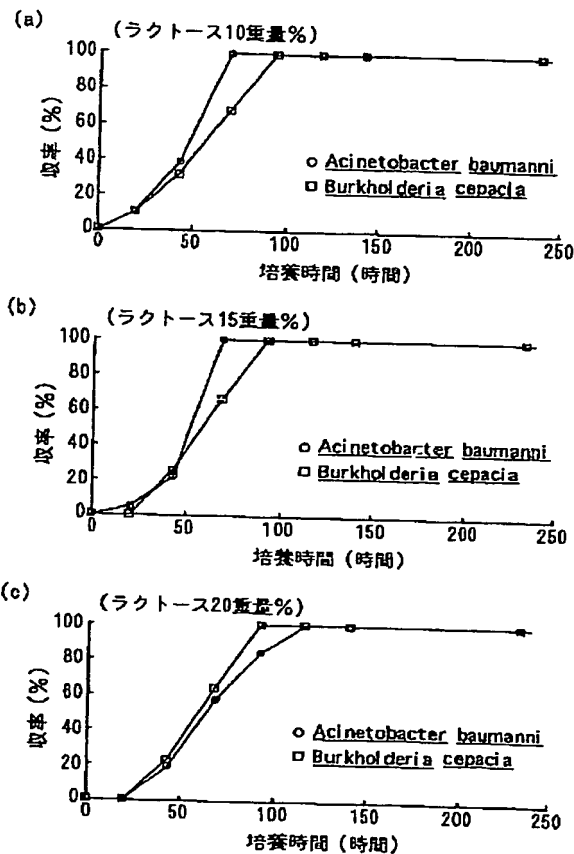
37

【図6】 本発明のさらにその他の実施例において、本発明のアルドン酸生成酵素のpH安定性を測定した結果を示すグラフである。

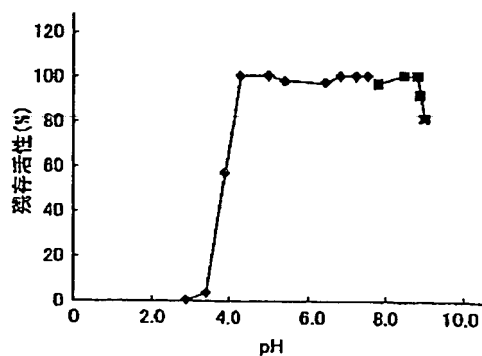
【図7】 本発明のさらにその他の実施例において、本発明のアルドン酸生成酵素のpH安定性を測定した結果を示すグラフである。

【図8】 本発明のさらにその他の実施例において、本発明のアルドン酸生成酵素の至適温度を測定した結果を示すグラフである。

【図1】



【図6】



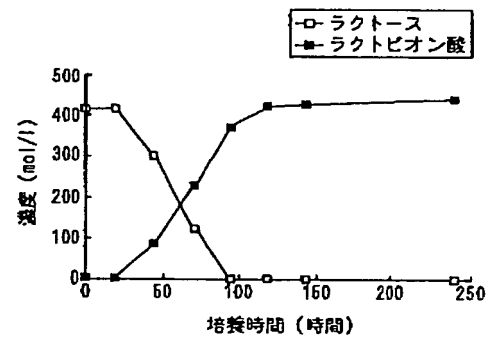
38

【図9】 本発明のさらにその他の実施例において、本発明のアルドン酸生成酵素の至適温度を測定した結果を示すグラフである。

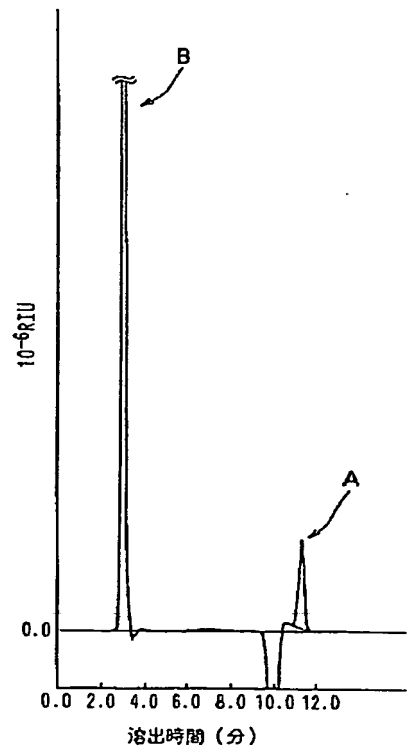
【図10】 本発明のさらにその他の実施例において、本発明のアルドン酸生成酵素の熱安定性を測定した結果を示すグラフである。

【図11】 本発明のさらにその他の実施例において、本発明のアルドン酸生成酵素の熱安定性を測定した結果を示すグラフである。

【図2】

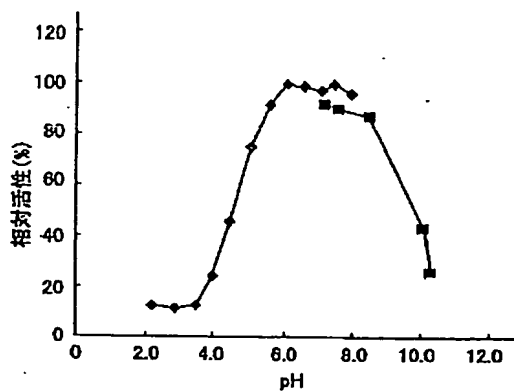


【図3】

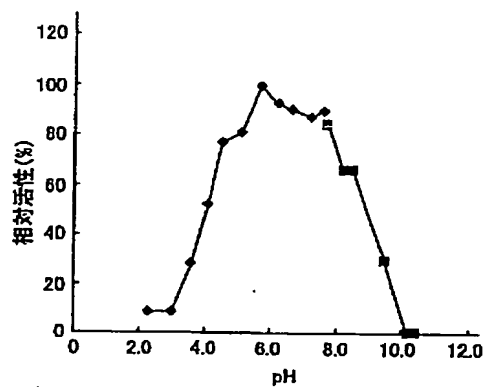


(21)

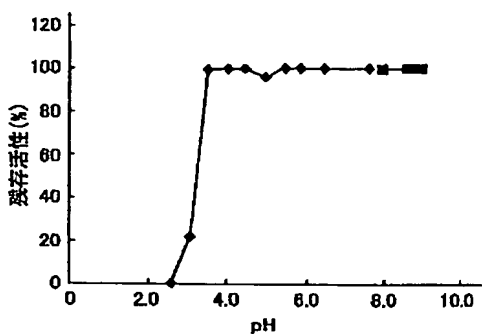
【図4】



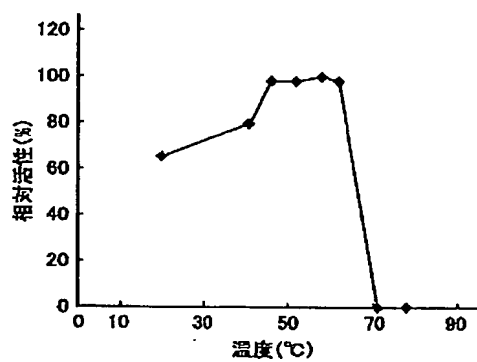
【図5】



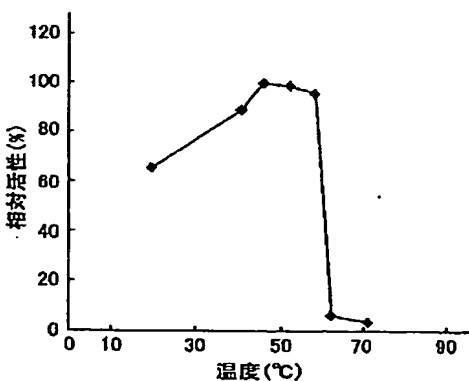
【図7】



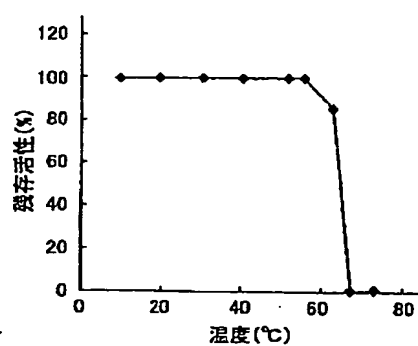
【図8】



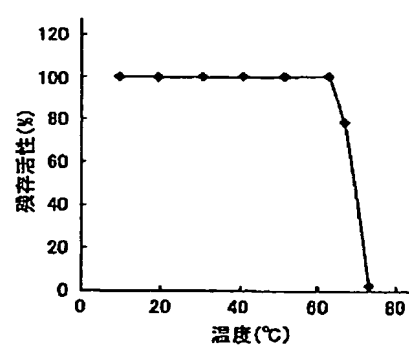
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

ターマート (参考)

// C 1 2 N 15/09

(C 1 2 N 1/20

A

(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:01)

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 1/14

A

(22)

(C 1 2 N 1/14
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 N 9/04
C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 N 9/04
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 P 7/58
C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 P 7/58
C 1 2 R 1:645)

C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 N 9/04 Z
C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 N 9/04 Z
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 P 7/58
C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 P 7/58
C 1 2 R 1:645)
C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 中野 博文
大阪府大阪市城東区森之宮 1 丁目 6 番50号
大阪市立工業研究所内

(72)発明者 村上 洋
大阪府大阪市城東区森之宮 1 丁目 6 番50号
大阪市立工業研究所内
(72)発明者 安積 眞澄
兵庫県三田市武庫ヶ丘 6 丁目12番 6 号
(72)発明者 瀬古 亜紀子
大阪府枚方市守山東町10番36号